

广西产兰香草 HPLC 指纹图谱分析*

甄丹丹¹, 何柳艳^{2**}, 莫缓恒², 唐春丽^{3**}, 张 森¹, 甄汉深¹

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西卫生职业技术学院, 广西南宁 530023; 3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530003)

摘要:以兰香草为研究对象,建立兰香草高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析方法,为今后的质量标准研究提供科学依据。采用高效液相色谱法对不同产地的兰香草进行指纹图谱分析,建立兰香草的 HPLC 指纹图谱。检测波长为 300 nm,梯度洗脱,在 100 min 内记录药材的指纹图谱。HPLC 指纹图谱标定了 8 个共有峰。10 批兰香草指纹图谱相似度较好,各批药材与对照指纹图谱间的相似度均在 0.9 以上。HPLC 指纹图谱的建立,初步为兰香草的质量标准的制定提供参考。

关键词:兰香草 高效液相色谱 指纹图谱 成分分析 中药

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2019)05-0522-05

0 引言

兰香草 *Caryopteris incana* (Thunb.) Miq. 是马鞭草科茛蓂属植物^[1],主要分布在亚洲东部和中部。在我国,广西分布较多。该属植物报道最多的化学成分是黄酮类,已报道的所含化学成分包括黄酮、烷酸、二烯豆甾醇、环烯醚萜、挥发油等^[1]。兰香草作为药材入药,内服可用于治疗风寒感冒、风湿麻痹等症;外敷可用于治疗出血、疮疖肿痛等^[2]。中药质量评价和控制是药材研究的热点之一,以往的评价方法只能针对单一的成分指标,难以反映药材的整体质量,而指纹

图谱可以对中药材的多个成分指标作评价,能够全面反映药材的整体质量^[3-11]。目前,对广西产兰香草指纹图谱未见有公开的报道,本文对广西产兰香草进行指纹图谱的研究,建立其高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,为科学评价和有效鉴别兰香草提供方法和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Millipore Simplicity-185 超纯水仪(美国密里博公

* 广西一流学科建设项目重点课题(2018XK052),广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZBZ14-07),壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号),广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号),广西重点学科壮药学项目(桂教科研[2013]16号)和广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目(J13162)资助。

【作者简介】

甄丹丹(1983—),女,助理研究员,主要从事中医药教学、科研和管理工作,E-mail:8zhen@163.com。

【**通信作者】

何柳艳(1977—),女,药师,主要从事医院药学研究,E-mail:13647182@qq.com;唐春丽(1980—),女,副主任中药师,主要从事医院药学研究,E-mail:1207298289@qq.com。

【引用本文】

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20191106.005

甄丹丹,何柳艳,莫缓恒,等.广西产兰香草 HPLC 指纹图谱分析[J].广西科学,2019,26(5):522-526.

ZHEN D D, HE L Y, MO Y H, et al. HPLC fingerprint analysis of *Caryopteris incana* (Thunb.) Miq. from Guangxi [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(5):522-526.

司);高效液相色谱仪(Alliance e2695,美国沃特世)。

试剂:乙腈、冰乙酸(色谱纯);水(超纯水);其他试剂均为分析纯。芦丁对照品(批号:0787-200102,中国药品生物制品检定所,供含量测定用)。

药材:本实验所用兰香草药材共10批(S1-S10),经广西一心药业副主任药师马利飞鉴定均为马鞭草科植物兰香草(*C. incana* (Thunb.) Miq)地上部分,详见表1。

表1 药材来源

Table 1 Source of medicinal materials

样品编号 Sample number	产地 Place of origin	采收时间 Collecting time
S1	广西隆安县 Longan County, Guangxi	2014. 03
S2	广西钦州 Qinzhou, Guangxi	2014. 05
S3	广西武鸣 Wuming, Guangxi	2014. 06
S4	广西防城港 Fangchenggang, Guangxi	2014. 07
S5	广西上思县 Shangsi County, Guangxi	2014. 09
S6	广西浦北县 Pubei County, Guangxi	2014. 10
S7	广西合浦县 Hepu County, Guangxi	2014. 12
S8	广西东兴县 Dongxing County, Guangxi	2015. 05
S9	广西中医药大学植物园 Botanical Garden of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine	2015. 08
S10	广西药用植物园 Guangxi Medicinal Herb Garden	2015. 10

1.2 实验方法

1.2.1 色谱柱的选择

进行预实验比较不同厂家色谱柱的分离效果。A:菲罗门 Phenomenex 00G-4435-E0 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); B:安捷伦 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); C: Wondasil C₁₈-WR (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果表明 A 色谱柱分离效果最好,在实验过程中 A 色谱柱能有效地分离主要化合物,并且基线比较平稳,分析时间较短,因此选择 A 色谱柱作为指纹图谱分析的色谱柱。

1.2.2 流动相系统的选择

从4种流动相系统中筛选适合的搭配:甲醇-水,甲醇-0.1%冰乙酸,乙腈-水,乙腈-0.1%冰乙酸。HPLC图谱的考察结果显示,甲醇-水、甲醇-0.1%冰乙酸系统信息较少,甲醇-水系统整体峰形不均匀,且信息少;甲醇-0.1%冰乙酸系统峰分离度低,整体峰形不均匀,基线不稳;乙腈-水分离度相对于甲醇-水、甲醇-0.1%冰乙酸这两个系统比较好,但峰分布不均匀;乙腈-0.1%冰乙酸系统整体峰形较好,分离度较好,提供信息较多。因此,确定流动相系统为乙腈-0.1%冰乙酸。

1.2.3 检测波长的选择

使用2998-DAD检测器对样品进行190~400 nm全波长扫描,获得3D色谱图(图1),并重点考查了250 nm、280 nm、300 nm、305 nm、310 nm波长处色谱峰,结果显示,图谱在300 nm处出峰较多,且各色谱峰峰形较好,分离较好,基线较平稳。因此,确定兰香草的检测波长为300 nm。

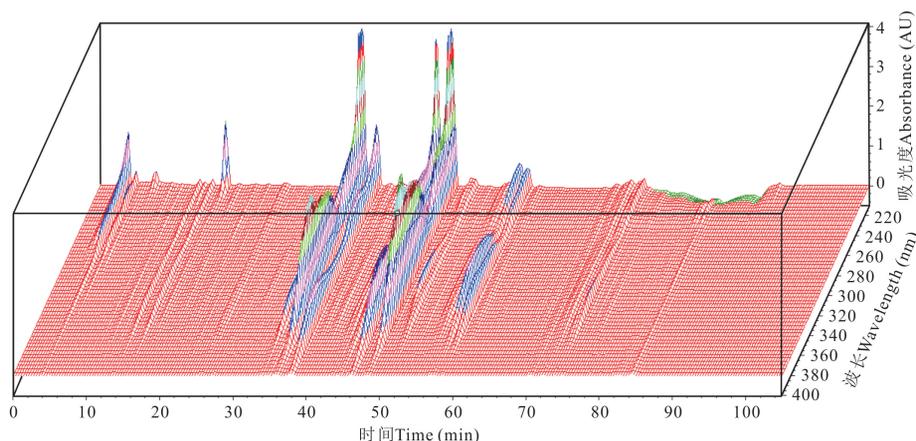


图1 兰香草全波长扫描3D色谱图

Fig. 1 Full wave length scanning 3D chromatogram of frankincense

1.2.4 柱温的选择

分别设定了 25℃、30℃ 不同的柱温进行考察,在其他色谱条件相同情况下,两个柱温的分离效果相差不大,但 25℃ 分离的效果相对较好,基于对色谱柱和仪器的保护,确定柱温为 25℃。

1.2.5 流速的选择

分别设定了 0.5 mL/min、0.8 mL/min、1.0 mL/min 不同的流速进行考察,在其他色谱条件相同情况下,两个流速的分离效果差别较大,0.8 mL/min 分离效果较差,信息量较少,峰形整体分布不均匀,而 1.0 mL/min 分离效果较好,峰分布较均匀,分离度较高,因此选择流速为 1 mL/min。

1.2.6 测定方法的确定

色谱柱为菲罗门 Phenomenex 00G-4435-E0 C₁₈ (250 mm×4.60 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 冰乙酸进行梯度洗脱,检测波长为 300 nm,流速为 1 mL/min,柱温为 25℃,进样量为 10 μL。梯度洗脱时间程序见表 2,理论塔板数大于 4 000,离度大于 1.5。

表 2 兰香草指纹图谱梯度洗脱程序时间

Table 2 Time of gradient elution procedure for fingerprint of vanilla

时间 Time (min)	乙腈 Acetonitrile (%)	0.1% 冰乙酸 0.1% Glacial acetic acid (%)
0	7.0	93.0
5	11.5	88.5
15	13.7	86.3
20	17.5	82.5
30	18.0	82.0
35	20.0	80.0
40	23.0	77.0
50	24.0	76.0
65	25.0	75.0
70	38.5	61.5
75	48.0	52.0
80	95.0	5.00

1.2.7 延长冲洗时间确定

取一供试品溶液,按 1.2.6 的条件进样,梯度洗脱 170 min。延长冲洗色谱图(图 2)显示,所有组分均在 100 min 内洗脱出柱,在 100 min 后已无峰,因此延长冲洗时间确定为 100 min。

1.3 方法学考察

1.3.1 考察提取溶剂

考察水、95%乙醇、乙酸乙酯、正丁醇的提取效果。进样 2 g,超声提取 45 min。结果显示,30 mL

95%乙醇提取效果最好,因此选择 95%乙醇作为提取溶剂。

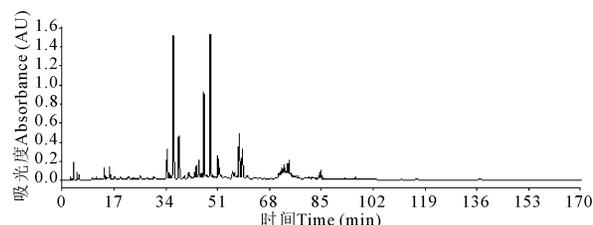


图 2 延长冲洗色谱图

Fig. 2 Extended rinse chromatogram

1.3.2 考察提取方法

考察了超声提取和回流提取,结果回流提取供试品溶液色谱图峰较少且峰较弱小,因此选择超声提取方法。

1.3.3 供试品溶液制备

综上预实验结果,确定供试品溶液制备方法:取兰香草药材粉末约 2 g,精密称定,置 50 mL 锤形瓶中,加入 30 mL 95%乙醇。超声 45 min,放冷,过滤,水浴锅上挥干溶剂,加 5 mL 甲醇溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.3.4 参照物的选择与配制

指纹图谱的建立必须设置参照峰,根据供试品中所含化学成分的性质,选择芦丁作为参照物,芦丁的色谱图见图 3。参照物溶液配置方法:精密称定芦丁对照品 56.66 mg,置于 25 mL 容量瓶中用甲醇溶剂溶解,定容至标定刻度。

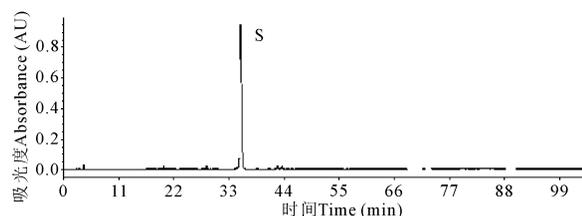


图 3 芦丁参照物色谱图

Fig. 3 Rutin reference chromatogram

1.3.5 精密度试验

制备供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 针,记录色谱图,计算兰香草保留时间和峰面积的精密度。结果:保留时间相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)值为 0.073%~0.305%,峰面积的 RSD 值为 0.081%~0.782%,精密度符合要求。

1.3.6 重复性试验

制备供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 针,记录色谱图,计算保留时间和峰面积的精密度。结果:保留时间 RSD 值为 0.024%~0.376%,峰面

积的 RSD 值为 0.182%~0.714%, 重复性符合要求。

1.3.7 稳定性试验

制备供试品溶液, 分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 检测图谱, 考察样品的稳定性。结果: 各色谱峰的相对保留时间 RSD 值为 0.050%~0.560%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.160%~0.790%, 稳定性符合

要求。

2 结果与分析

2.1 兰香草的指纹图谱和共有峰

从 10 个产地来源的药材中各取一批作为样本 (S1—S10), 进行色谱测定。结果 (图 4) 显示, 这 10 批兰香草指纹图谱高度相似。

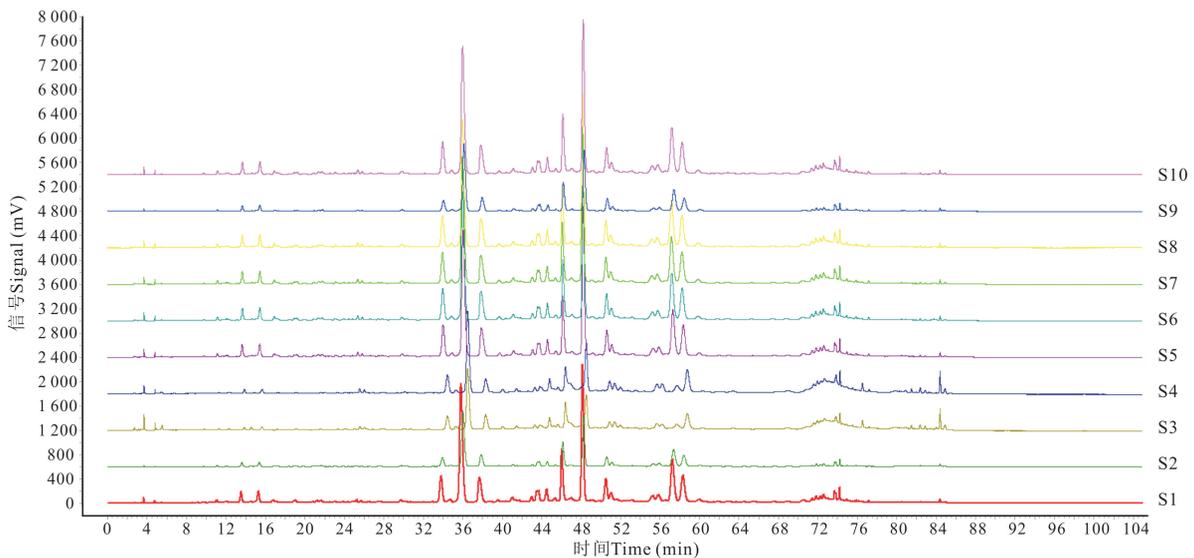


图 4 10 批兰香草的指纹图谱

Fig. 4 Fingerprint of 10 batches of vanilla

以 1 号药材为参照图谱, 采用《中国药典》颁布的指纹图谱相似度评价软件, 对 10 批兰香草的 HPLC 色谱图进行自动匹配, 时间窗宽度为 0.1 min, 以平均数法生成对照指纹图谱 (图 5)。由图可见, 兰香草指纹图谱共有峰为 8 个, 其中 4 号峰也是参照物芦丁的参照峰, 说明芦丁为兰香草中成分含量比较稳定的成分。设定参照峰的相对保留时间和相对峰面积为 1, 以此为基准分别计算出 10 批兰香草的相对保留时间和相对峰面积, 结果兰香草相对保留时间 RSD 值为 0.067%~0.833%, 相对峰面积 RSD 值为 7.17%~24.50%, 指纹图谱共有峰的面积占比为 91.38%

94.66%, 说明其重现性较好。

2.2 不同药材来源的兰香草指纹图谱比较

以 1 号样品图谱为参照谱, 再自动匹配, 以平均数的方式生成共有模式图谱 R, 进行整体相似度评价。结果表明, 广西各产地 10 批兰香草的相似度, 广西中医药大学植物园为 0.875~1.000; 钦州为 0.879~1.000; 武鸣为 0.866~1.000; 防城港为 0.876~1.000; 上思县为 0.866~1.000; 浦北县为 0.892~1.000; 合浦县为 0.966~1.000; 东兴县为 0.865~1.000; 广西药用植物园为 0.892~1.000, 经计算符合中药指纹图谱的规定均大于 0.9, 说明不同产地来源的兰香草质量相对都比较稳定, HPLC 法可适用于兰香草的质量评价和控制。

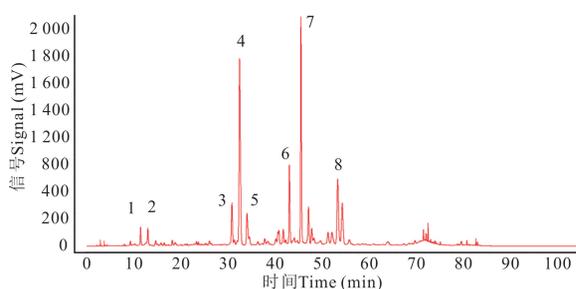


图 5 兰香草对照指纹图谱

Fig. 5 Control fingerprint of vanilla

3 结论

采用色谱法对中药进行指纹图谱研究已有相应报道^[3-11], 本实验对不同来源的 10 批兰香草进行 HPLC 色谱分析, 获得了兰香草指纹图谱对照指纹图谱。用 95% 乙醇提取兰香草化学成分, 得到的指纹图谱杂质峰相对其他溶剂较少、信号较多, 有效成分峰更具有代表性。通过对流动相系统的优化, 确定流

动相为乙腈-0.1%冰乙酸,此系统梯度洗脱分离效果较好,重现性良好。该洗脱系统参照峰出峰时间比较适宜,作为参照物进行相对保留时间和峰面积计算,符合指纹图谱研究要求。从实验的数据分析可看出,各批次的共有峰的相对保留时间与相对峰面积都非常接近。从相似度可看出,10批兰香草的相似度都大于0.9,符合中药指纹图谱的规定,说明兰香草质量比较稳定,可用于兰香草的内在质量控制。

参考文献

- [1] 将竞. 唐古特藜及青海毛冠菊的化学成分研究[D]. 南京:东南大学,2008.
- [2] 陈红梅,孙凌峰,叶文峰. 兰香草挥发油化学成分的研究[J]. 井冈山师范学院学报:自然科学版,2004,25(6):5-8.
- [3] 刘布鸣,林霄,董晓敏,等. 香茅油的气相色谱指纹图谱研究[J]. 广西科学,2010,17(4):343-346.
- [4] 杨辉,林霄,刘布鸣,等. 巨尾桉挥发油的气相色谱指纹图谱研究[J]. 广西科学,2012,19(3):241-243.
- [5] 刘布鸣,柴玲. 色谱指纹图谱在精油质量分析中的应用研究进展[J]. 广西科学,2015,22(2):135-142.
- [6] 喻军,莫建光,陈秋虹,等. 金花茶叶多酚类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广西科学,2019,26(2):238-244.
- [7] 黄红泓,丘琴,甄丹丹,等. 不同产地龙利叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2019,37(3):142-147.
- [8] 周曙光,甄丹丹,陈明伟,等. 玉米苞叶 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 广西中医药,2019,42(2):65-71.
- [9] 丘琴,甄汉深,陈明伟,等. 壮药龙利叶茎 HPLC 指纹图谱研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2016,34(2):116-121.
- [10] 吴梅,李宏哲,薛咏梅,等. 小白及高效液相指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):180-186.
- [11] 郭慧清,李娅琦,王梓轩,等. 不同商品规格羌活药材的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(7):184-188.

HPLC Fingerprint Analysis of *Caryopteris incana* (Thunb.) Miq. from Guangxi

ZHEN Dandan¹, HE Liuyan², MO Huanheng², TANG Chunli³, ZHANG Miao¹, ZHEN Hanshen¹

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Guangxi Health College, Nanning, Guangxi, 530023, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530003, China)

Abstract: Taking *Caryopteris incana* (Thunb) Miq. as the research object, the HPLC fingerprint analysis method was established to provide scientific basis for future quality standard research. Fingerprint analysis of *Caryopteris incana* (Thunb) Miq. from different habitats was carried out by high performance liquid chromatography, and the HPLC fingerprint of *Caryopteris incana* (Thunb) Miq. was established. The detection wave length was 300 nm, after gradient elution, the fingerprint of the medicinal material was recorded within 100 min. HPLC fingerprints were calibrated for 8 common peaks. The similarity of the fingerprints of 10 batches of *Caryopteris incana* (Thunb) Miq. was better, and the similarity between the batches of herbs and the control fingerprints was above 0.9. The establishment of HPLC fingerprints provides a preliminary reference for the development of quality standards for *Caryopteris incana* (Thunb) Miq.

Key words: *Caryopteris incana* (Thunb) Miq., HPLC, fingerprint, component analysis, traditional Chinese medicine

责任编辑:符支宏